



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06197650 A**(43) Date of publication of application: **19 . 07 . 94**

(51) Int. Cl

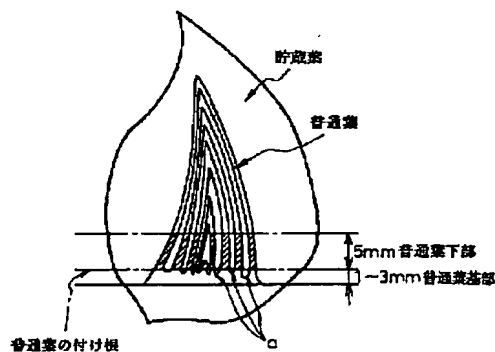
A01H 4/00
// C12N 5/04(21) Application number: **05175577**(22) Date of filing: **15 . 07 . 93**(30) Priority: **13 . 11 . 92 JP 04304027**(71) Applicant: **WAKUNAGA PHARMACEUT CO LTD**(72) Inventor: **AYABE MASANORI**
YAMAMOTO YOSHIE
SUMI SHINICHIRO**(54) PREPARATION OF REDIFFERENTIATED BODY OF ALLIUM PLANT****(57) Abstract:**

PURPOSE: To readily and massively provide allium redifferentiated plants in a high yield by a simple method without requiring a complicated shoot apex-picking work by artificially culturing the common leaf, especially its lower part or base part, of an Allium plant as an explant piece.

CONSTITUTION: The method for preparing the redifferentiated body of an Allium plant is characterized by using the common leaf lower part and/or common leaf base part of the Allium plant such as Allium sativum L. as an explant. For example, the method for preparing the plant body comprises separating the scaly bulb of the Allium sativum L. into small scaly bulbs, removing outer skins from the small scaly bulbs, washing the small scaly bulbs with a benzalkonium chloride solution and water, cutting the washed bulbs into cubic pieces having a length of approximately 1cm, immersing the pieces in 70% ethanol for 5min, washing the pieces with sterilized water for their sterilization, removing the left storage leaf parts to expose the common leaf parts, cutting off the upper parts of the common leaf parts, stripping off the left ordinary leaf lower parts for using as explant pieces, inserting the formed explant pieces in a medium, and subsequently subjecting

the inserted explant pieces to a standing culture at 25°C for 16hrs a day for a period of 2-3 weeks. Thus, the objective Allium plant redifferentiated bodies are obtained in high efficiency by the simple method.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-197650

(43)公開日 平成 6 年(1994) 7 月19日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 H 4/00		8502-2B		
// C 1 2 N 5/04		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00	F

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全 7 頁)

(21)出願番号	特願平5-175577	(71)出願人	000250100 湧永製薬株式会社 大阪府大阪市中央区伏見町 4 丁目 2 番14号
(22)出願日	平成 5 年(1993) 7 月15日	(72)発明者	綾部 昌則 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内
(31)優先権主張番号	特願平4-304027	(72)発明者	山本 好恵 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内
(32)優先日	平 4 (1992)11月13日	(72)発明者	角 慎一郎 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(74)代理人	弁理士 宇井 正一 (外 4 名)

(54)【発明の名称】 アリウム属植物再分化植物体の調製法

(57)【要約】

【構成】 アリウム (Allium) 属植物の普通葉、特に普通葉下部または普通葉基部を外植片として用いることを特徴とする前記植物の再分化植物体の調製法。

【効果】 簡便な方法により高い効率でアリウム属植物の再分化植物体が得られる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アリウム (Allium) 属植物の普通葉を外植片として用いることを特徴とする前記植物の再分化植物体の調製法。

【請求項2】 前記普通葉が普通葉下部および／または普通葉基部である請求項1記載の調製法。

【請求項3】 前記普通葉が普通葉基部である請求項1記載の調製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、再分化植物体の調製法に関する。さらに具体的には、本発明は、アリウム (Allium) 属植物を人工培養により増殖させる際に用いる再分化植物体の調製法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】アリウム属植物としては、ニンニク、タマネギ、ラッキョウ、ネギ、ワケギ、ニラ、アサツキ等が挙げられる。これらの植物は食用、香辛料として広く利用されている。また、ニンニクは古くから薬効も認められていて、強精、強壮薬としても利用されている。栽培は日本各地で行われているが、近年、ウイルスによる被害が問題となっている。

【0003】このようなウイルスとして、例えばニンニクでは、ニンニクモザイクウイルス (Garlic mosaic virus GMV) とニンニク潜性ウイルス (Garlic latent virus GLV) の2種が知られており、特に前者の被害が著しく、モザイク症状を呈するのが特徴である。ニンニクは栄養繁殖性の作物であるため、一度ウイルスに感染すると後代にまで伝播してウイルス汚染が広がるということが知られている。ニンニク以外のアリウム属植物でも同様の被害が知られており、このようなウイルス汚染に対する根本的な防除対策を講ずる必要に迫られている。

【0004】一方、近年、植物の組織培養法が確立され、この技術を応用して各種栄養繁殖性植物のウイルス除去が可能となってきた。一般に、ウイルスに汚染された植物であっても茎頂組織 (生長点、meristem) にはウイルスが存在していないことが知られている。従って、この茎頂組織を培養して植物体を再分化させることにより、ウイルス無感染の植物 (ウイルスフリー株) を得ることができる。また、植物組織を培養してカルスを形成させ、そのカルスを継代培養していくことによりウイルスが除去されることも知られている。こうしてウイルスが除去されたカルスより植物体を再分化させることにより、ウイルス無感染の植物を得ることもできる。

【0005】ニンニクに代表されるようなアリウム属植物についても上記方法によりウイルスを除去することが行われており、ウイルス無感染のアリウム属植物が実際に栽培されている。ところで、上記のウイルス除去法には以下のような問題点がある。例えば、茎頂組織を培養

2

してウイルス無感染のアリウム属植物を得る方法では、通常、一つの茎頂組織からは一個体もしくは数個体の植物体しか得ることはできないので、多数の植物体を得るには、それと同等数の茎頂組織を摘出することが必要である。

【0006】最近、植物ホルモン、特にサイトカイニンを用いることによって茎頂から十数個体の植物体を再分化させる培養法が報告されている。しかし、いずれにしても培養を行うためにはまず相当数の茎頂を摘出する必要がある。茎頂組織はニンニク鱗片の基部にあり大きさは約0.5mm以下である。そのため茎頂の摘出には顕微鏡下での作業が必須である。従って、茎頂摘出作業は煩雑であり、また、作業効率が非常に低い。

【0007】これらの問題点の解決策の一つとしては、カルスから植物体を再分化させて大量に再分化植物体を得る方法の利用が考えられる。すなわち、一度カルスを誘導すればそのカルスを大量に増殖させることが可能であり、従って再分化植物体も大量に得ることができる。しかし、カルス培養の際に頻発する変異のため、均一な遺伝的性質を持ったアリウム属植物を得る上で依然として解決すべき問題点が存在する。

【0008】他方、植物の組織培養技術の発展は遺伝子の導入による形質転換植物、異種の植物細胞を融合させて得る体細胞雑種植物の作出も可能とし、いくつかの植物では成功例が報告されている。しかし、このような技術を利用するためには、まず、効率よく、再現性のある再分化植物体調製法の確立が必須である。すなわち、形質転換を行うためにはプロトプラストを調製し、遺伝子を導入する方法や、植物の組織に細菌を感染させて遺伝子を導入する方法などがあるが、いずれの場合も遺伝子を導入した細胞、組織から植物体を再分化させる必要がある。同様に細胞融合においても融合させた細胞から植物体を再分化させる必要がある。

【0009】しかし、アリウム属植物では、効率よい再分化植物体調製法が確立されたものが少ないため、形質転換植物、体細胞雑種植物の作成に成功した例は少ない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】以上のように、ウイルス無感染 (またはウイルスフリー) 化、形質転換植物の作出、体細胞雑種植物の作出等のいずれにおいても効率よく再分化植物体を調製する方法の確立が望まれるであろう。従って、本発明の目的はアリウム属植物の効率のよい再分化植物体の調製法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、アリウム属植物の特定の植物体部分を器内で培養することにより対応する植物の再分化植物体が効率よく得られることを見出し完成するに至った。従って、上記課題は、アリウム属植物の普通葉下部および／または普通葉基部を外植片

として用いることを特徴とする前記植物の再分化植物体の調製法の提供により解決される。

【0012】さらに、本発明の好ましい態様としては、アリウム属植物の普通葉として、特に普通葉基部を用いる前記植物の再分化植物体の調製法を提供する。

【0013】

【具体的な態様】

(a) アリウム属植物体

本発明でいうアリウム属植物とは、ゆり科 (*Liliaceae*) アリウム属に属する植物を指し、例えばアリウム・サチバム・リンネ [*Allium sativum* L. formepekinense Hakino、一般名ニンニク]、アリウム・セバ [*Allium cepa*、一般名タマネギ]、アリウム・チャイネンヌ [*Allium chinense*、一般名ラッキョウ]、アリウム・アムペロプラズム [*Allium ampeloprasum*、一般英名 great headed garlic あるいは elephant garlic (エレファントガーリック)] 等が挙げられる。

【0014】(b) 外植片の調製

本発明では外植片 (植え込みに用いる組織片) として、普通葉下部、普通葉基部を用いる。これらの外植片はアリウム属植物の鱗茎より摘出する。ここで、普通葉下部とは普通葉の付け根より0.5~1.0cm上部までをいい、普通葉基部とは普通葉の付け根より0.1~0.3cm下部までをいう。なお、普通葉基部を外植片として使用する場合、普通葉と普通葉との間の部分 (図1におけるaの部分) を残すようにするのが好ましい。

【0015】鱗茎から普通葉下部および/または普通葉基部を摘出する方法としては、例えば、鱗茎または適当な大きさに切断した鱗茎を次亜塩素酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム、エチルアルコール等の植物細胞に影響が少ない殺菌剤で殺菌し、ついで殺菌水で十分洗浄後、貯蔵葉を取り除き、普通葉を露出させ上部を切断除去した後、この普通葉下部および/または普通葉基部を直接または適当な大きさに切りとり、培養に供する。本発明ではこのように一つの鱗茎から普通葉下部および/または普通葉基部を摘出し、多数の外植片を調製して培養に供することが可能である。

【0016】(c) 使用培地

ここで培地としては少なくとも無機塩類、ビタミン等の有機成分、炭素源、植物生長調節物質等の植物の生育に必要な成分を含む任意の培地を用いることができる。本発明で用いる基本培地としては、ムラシゲ・スクーグ培地、リンスマイヤー・スクーグ培地が望ましい。そして特に外植片として普通葉下部を用いる場合、この基本培地に植物生長調節物質を添加することもできる。植物生長調節物質としては、オーキシシン (インドール-3-酢酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、1-ナフタレン酢酸等) とサイトカイニン類 (カイネチン、6-ベンジルアミノプリン、ゼアチン等) とを組み合わせ用いる。

【0017】培地は上記したような基本培地と必要な成分とからなるが、アリウム属植物から再分化植物体を得る場合は、基本培地としてリンスマイヤー・スクーグ培地を用い、植物生長調節物質として1-ナフタレン酢酸と6-ベンジルアミノプリンを0~10mg/L好ましくは0~1.0mg/L程度含有するものが好ましい。

【0018】(d) 培養

上記培地に (a) で示したようにして調製した外植片を植え込み、植物のよく生育できる温度下 (10~30℃好ましくは20~26℃) 500~15000ルクス、好ましくは3000~8000ルクスの照明下 (1日あたり9~18時間好ましくは12~16時間) で培養を行うことにより1~2ヶ月で再分化植物体を得ることができる。なお (b) においてウイルスフリーのアリウム属植物の鱗茎を用いれば、得られる再分化植物体もウイルスフリーである。

【0019】

【実施例】以下実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、これらのいずれかの態様に本発明を限定することを意図するものではない。

実施例1

本実施例では、アリウム属植物のうちニンニク (*Allium sativum* L.) の普通葉下部を外植体とした再分化培養についてその培養方法を示す。

【0020】培養の材料としては、福地ホワイト種のニンニクを用いた。

1. 材料の殺菌

まず、ニンニクの鱗茎を小鱗茎に分解した後、外皮を除去した。次いで、塩化ベンザルコニウム溶液及び水で洗浄後、小鱗茎の基部を約1cmの立方体状に切断した。この切片を70%エタノールに5分間浸漬した後、滅菌水で洗浄した。

【0021】2. 外植片の調製

材料の殺菌後、残っている貯蔵葉部分を取り除き、普通葉を露出させた。普通葉の高さが0.5cm程度になるように上部を切りとり、残った普通葉下部をはぎ取って外植片とした。

【0022】3. 培地

リンスマイヤーとスクーグの培地 (以下、LS培地) を基本培地とし、これに植物ホルモンのナフタレン酢酸 (以下、NAA) とベンジルアデニン (以下、BA) をそれぞれ0, 0.01, 0.1, 1.0mg/Lの濃度で添加し、16通りのホルモン条件を作製し (表1)、培養に用いた。

4. 培養

調製済みの外植片を16通りのホルモン条件の培地に基部より挿し込み、25℃、16時間照明で静置培養を行った。

【0023】5. 植物体の再分化

50 培養を開始して2~3週間目に、外植片基部からの再分

化が始まった。その後、2ヶ月以内に発根した再分化植物体を得ることができた。表1に各ホルモン条件下での再分化の効率（外植片数に対する再分化植物体数の割合）を示した。表に示したようにすべてのホルモン条件下で再分化植物体が得られた。

【0024】特に、NAA0.01mg/L+BA0.1mg/LおよびNAA0.1mg/L+BA1.0mg/L添加培地では80%以上の再分化効率を示した。この条件*

再分化効率（ニンニク）

BA (mg/L) \ NAA (mg/L)	0	0.01	0.1	1.0
0	6	38	29	33
0.01	7	38	82	48
0.1	3	25	61	80
1.0	4	6	25	60

表中の数値(%) = (再生植物体数/植え込んだ切片数) × 100

【0026】実施例2

本実施例では、アリウム属植物のうちタマネギ (*Allium cepa*) を用いた再分化培養法についてその培養法を示す。培養は実施例1と同様に行った。すなわち普通葉外植片を調製し、16通りのホルモン条件下のLS培地に植え込んで培養を行った。

【0027】その結果を表2に示した。16通りのホル※

再分化効率（タマネギ）

BA (mg/L) \ NAA (mg/L)	0	0.01	0.1	1.0
0	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.1	0	0	0	23
1.0	0	0	0	47

表中の数値(%) = (再生植物体数/植え込んだ切片数) × 100

【0029】実施例3

本実施例では、アリウム属植物のうちラッキョウ (*Allium chinense*) を用いた再分化培養法についてその培養法を示す。培養は実施例1と同様に行った。すなわち普通葉外植片を調製し、16通りのホルモン条件下のLS培地に植え込んで培養を行った。

【0030】その結果を表3に示した。16通りのホル

*では1鱗茎から約15個体、1個体から約100個体の再分化植物体が得られることになる。また、再分化植物体には小球を形成するものもあり、特にBA0.01mg/L添加培地では再分化植物体の50%が小球を形成した。

【0025】

【表1】

※モン条件のうち2通りの条件で再分化植物体が得られた。そのうちNAA, BAとも1.0mg/L添加では47%の再分化効率を示した。この条件ではタマネギ1個体から約15個体の再分化植物体得られることになる。

【0028】

【表2】

モン条件のうち8通りの条件で再分化植物体が得られた。特に、NAA1.0mg/L+BA0.1mg/LとNAA1.0mg/L+BA1.0mg/Lの2通りのホルモン条件下では100%の再分化効率を示した。この条件下ではラッキョウ1個体から約70個体の再分化植物体得られることになる。

【0031】

【表3】

再分化効率（ラッキョウ）

BA (mg/L) \ NAA (mg/L)	0	0.01	0.1	1.0
0	0	0	3	0
0.01	0	0	43	0
0.1	0	47	20	0
1.0	10	17	100	100

表中の数値 (%) = (再生植物体数 / 植え込んだ切片数) × 100

【0032】実施例4

本実施例では、アリウム属植物のうちワケギ (*Allium fistulosum* L. var. *caespitosum* Makino) を用いた再分化培養法についてその培養法を示す。培養は実施例1と同様に行った。すなわち普通葉外植片を調製し、16通りのホルモン条件のLS培地に植え込んで培養を行った。

【0033】その結果を表4に示した。16通りのホル*

*モン条件下のうち2通りの条件で再分化植物体が得られた。そのうちNAA 1.0 mg/L + BA 1.0 mg/L 添加では47%の再分化効率を示した。この条件ではワケギ1個体から約30個体の再分化植物体が得られることになる。

【0034】

【表4】

再分化効率（ニンニク）

普通葉基部を外植片として用いた場合

BA (mg/L) \ NAA (mg/L)	0	0.1	1.0
0	100	66	48
0.1	52	25	30
1.0	0	6	7

数値はNAA 0 mg/L、BA 0 mg/Lの場合の再分化植物体数を100とした場合の比率 (%)

【0035】実施例5

本実施例では、アリウム属植物のうちニンニク (*Allium sativum* L.) を用い、普通葉基部を外植片とした再分化培養についてその培養方法を示す。培養の材料としては、福地ホワイト種のニンニクを用いた。

1. 材料の殺菌

まず、ニンニクの鱗茎を小鱗茎に分解した後、外皮を除去した。次いで、塩化ベンザルコニウム溶液及び水で洗浄後、小鱗茎の基部を約1cmの立方体状に切断した。この切片を70%エタノールに5分間浸漬した後、滅菌水で洗浄した。

【0036】2. 外殖片の調製

材料の殺菌後、残っている貯蔵葉部分を取り除き、普通葉を露出させ、普通葉をはぎ取った。そして普通葉をはぎ取った後の基部を約2mmの厚さに切りとり外植片とした。

【0037】3. 培地

リンスマイヤーとスクーグの培地（以下LS培地）を基本培地とし、これに植物ホルモンのナフタレン酢酸（以下NAA）とベンジルアデニン（以下BA）をそれぞれ0、0.1、または1.0 mg/lの濃度で添加し、9通りのホルモン条件を作製し培養に用いた。

4. 培養

50 調製済みの外殖片を9通りのホルモン条件の培地に置床

し、25℃、16時間照明で静置培養を行った。

【0038】5. 植物体の再分化

培養を開始して5日目に、外植片からの再分化が始まった。まず、外植片とした普通葉基部のうち、普通葉を除いた後に残る普通葉と普通葉の間の組織から茎頂組織に類似したドーム状の組織が形成された。このドーム状組織は外部形態が茎頂に類似していた。また、組織切片の観察の結果、ドーム状組織の内部構造も茎頂の内部構造に類似しているものと考えられた。このドーム状組織が緑化、生長し植物体となった。培養を開始して3週間目には1cm以上の植物体となり、さらに培養を継続すると発根し、鉢上げ可能な植物体となった。

*

再分化効率（ニンニク）

普通葉基部を外植片として用いた場合

BA(mg/L) \ NAA(mg/L)	0	0.1	1.0
0	100	66	48
0.1	52	25	30
1.0	0	6	7

数値はNAA 0 mg/L、BA 0 mg/Lの場合の再分化植物体数を100とした場合の比率（％）

このように普通葉の基部を外植片とした再分化培養は、短期間で再分化植物体が得られること、再分化効率が高いこと、再分化に植物ホルモンの添加を必要としないことなどの特徴をもっている。

【0041】6. 小球形成

ここに示した培養法において、材料とするニンニクを予め低温処理することにより、再分化植物体に小球を形成させることができた。すなわち、2週間以上4℃前後の低温下でニンニクを貯蔵した後に培養に用いることによって得られる再分化植物体は高率で小球を形成した。特に2か月以上低温処理をしたニンニク鱗茎から得られた再分化植物体は90%以上のものが小球を形成した。

【0042】この小球は培養容器から取り出して、保存することが可能で、また通常の用土に植え付けることによって発芽し、栽培を行うことが可能である。したがって、通常、培養によって得られた再分化植物体を培養容器から取り出して栽培する際に必要である順化作業が不要である。

【0043】

【発明の効果】本発明による再分化植物体の調製法によれば、アリウム属再分化植物体を大量に得ることができ

*【0039】前述した9通りのホルモン条件では、ホルモンを含まない培地での再分化が最も効率が高く、1鱗茎から20-30本の再分化植物体を得られた。通常、ホワイト種ニンニク1個体は6個の小鱗茎を持っているので、1個体から120-180本の再分化植物体得られることになる。NAAおよびBAを含む培地では再分化の効率はホルモンを含まない培地よりも低く、また、ホルモンの濃度が高くなるにつれて再分化は抑制されていた。結果を次の表5に示す。

【0040】

【表5】

る。すなわち、従来のアリウム属植物の茎頂培養およびカルス培養により再分化植物体を得る方法には、前記したような問題があったのであるが、これに対して本発明は普通葉を外植片とするため煩雑な茎頂摘出作業を行う必要がなく、容易に、大量の外植片を調製することが可能である。

【0044】従って、効率よく大量の再分化植物体を得ることができる。また外植片から直接植物体が再分化するため、培養に要する期間が1-2ヶ月と短く、変異も少ない。ここで、培養に用いるアリウム属植物としてウイルスフリー株を用いれば、再分化植物体もウイルスフリーであり、ウイルスフリー株の大量増殖も可能である。

【0045】また普通葉下部、普通葉基部に遺伝子を導入した後、本発明による再分化植物体の調製法に供すればアリウム属の形質転換植物体を得ることができる。更に、再分化植物体に発芽可能な小球を形成させることができるため、順化作業を必要とせず、また小球は保存も可能で任意の時期に植えこみを行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ニンニク鱗茎の断面を略図的に示す。

【図1】

